

# Kemija zmijskog ugriza

---

**Mikša, Monika**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:600612>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Monika Mikša

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **KEMIJA ZMIJSKOG UGRIZA**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš

Zagreb, 2019.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

3. lipnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Općenito o zmijskim ugrizima.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Otrovnne i neotrovnne zmije .....</b>	<b>3</b>
<i>1.2.1. Glavne razlike otrovnih i neotrovnih zmijsa .....</i>	<i>3</i>
<i>1.2.2. Ugriz i posljedice ugriza .....</i>	<i>4</i>
<b>§ 2. OTROVI I PROTUOTROVI.....</b>	<b>VI</b>
<b>2.1. Zmijski otrovi.....</b>	<b>vi</b>
<i>2.1.1. Osnovno o otrovima.....</i>	<i>vi</i>
<i>2.1.2. LD<sub>50</sub> test.....</i>	<i>vii</i>
<i>2.1.3. Podjela otrova .....</i>	<i>viii</i>
<i>2.1.4. Enzimi u otrovima.....</i>	<i>x</i>
<b>2.2. Protuotrovi.....</b>	<b>xii</b>
<i>2.2.1. Metoda priprave protuotrova .....</i>	<i>xii</i>
<i>2.2.2. Vrste protuotrova.....</i>	<i>xii</i>
<i>2.2.3. Buduća istraživanja .....</i>	<i>xiv</i>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XVI</b>



## § Sažetak

Procjenjuje se da u svijetu ima više od 3500 vrsta zmija, među kojima je oko 600 otrovnih vrsta. Dok u nekim zemljama uopće nema zmija zbog geografskog položaja ili nepovoljne klime (Novi Zeland, Antarktika, Irska, Island...), u drugima je pojava zmije uobičajena. Južni dio Azije naseljava najveći broj zmijskih vrsta, a posebno treba istaknuti Indiju, gdje je ugriz zmije česti problem. Pod ugriz se obično misli na ugriz zmija otrovnica, jer ugriz neotrovne zmije u pravilu ne uzrokuje toliko ozbiljne posljedice.

Otrov zmije je jedan oblik sline, a sastoji se od mnogo komponenti te se prema djelovanju i posljedicama na organizam otrovi mogu podijeliti na citotoksične, neurotoksične i hemotoksične. Citotoksični su štetni za stanice i tkiva, neurotoksični za živčani sustav i procese, a hemotoksični djelovanjem na krvne stanice uzrokuju krvarenja. Iako postoje različiti načini utvrđivanja toksičnosti otrova, ona se najčešće mjeri LD<sub>50</sub> testom.

Djelovanje otrova poništava se djelovanjem protuotrova. Protuotrov se dobiva tako da se ubrizga manje količine razrijeđenog otrova u životinje, obično ovce, koze ili konje. Zatim se uzme krv životinje i odvajaju se specifična antitijela stvorena tijekom 2 – 3 mjeseca. Antitijela su temelj u daljnjim procesima dobivanja protuotrova. Protuotrov dobiven takvim postupkom se ubrizga u venu osobe koju je ugrizla zmija tako da se može pomiješati s krvlju i početi djelovati, no i tu postoje mnogi problemi. Često se događa da osoba dobije protuotrov namijenjen ugrizu neke druge zmije i zbog toga nije dovoljno učinkovit, npr. protuotrov namijenjen ugrizima otrovnica u Indiji djeluje slabo ili ne djeluje uopće protiv otrova afričkih zmija. Protuotrovi loše kvalitete sadrže premalu koncentraciju antitijela i puno konzervansa koji doprinose njihovom bržem kvarenju, a često su pušteni u uporabu jer su jeftiniji i lakše dostupni. Protuotrovi prave kvalitete su skupi i mnogo ljudi si ih ne može priuštiti. Još jedan problem je pohrana i skladištenje protuotrova. Oni se moraju čuvati na hladnom kako se ne bi pokvarili, a u mnogim ruralnim područjima ne postoje odgovarajući skladišni prostori i hladnjaci za to.




Svi ovi problemi dovode do velikog broja smrtnih slučajeva zbog zmijskih ugriza. Zato se stalno radi na usavršavanju postojećih i istraživanjima s ciljem dobivanja novih protuotrova kako bi takvih slučajeva bilo što manje.



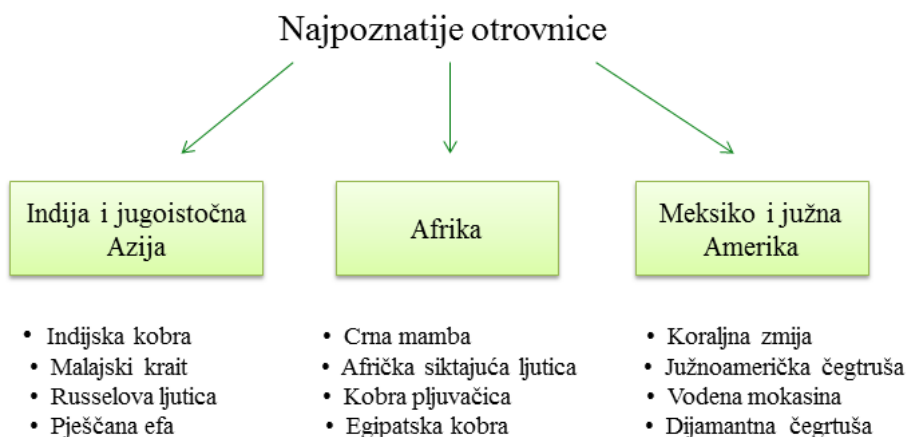
## § 1. UVOD

### 1.1. Općenito o zmijskim ugrizima

Iako se ne pridaje toliko pažnje zmijskim ugrizima, pogotovo ugrizima neotrovnih zmija, oni su danas prilično velik problem. Zmije ne napadaju ljude osim ako se osjećaju ugroženo pa je najbolje previše im se ne približavati. Iako je ugriz otrovne zmije opasniji upravo iz razloga što one ispuštaju otrov, ugrizi neotrovnih zmija, ako se ne liječe, također mogu rezultirati smrću zbog mogućih pojava infekcija ili alergijske reakcije. Poznato je da više od 130 000 ljudi godišnje diljem svijeta umre zbog teških posljedica uzrokovanih ugrizom zmija otrovnica. Uzroci tolike smrtnosti su različiti. Najviše pogođeni dijelovi svijeta su južna i jugoistočna Azija, Afrika te srednja i južna Amerika (slika 1), posebno sela i ruralna područja. Takva mjesta su prilično udaljena, pa je dostava protuotrova otežana, a često i nedovoljno brza. Najveći broj zmijskih ugriza pogađa farmere i djecu, koji se za pomoć najprije obraćaju lokalnim iscjeliteljima. Oni najčešće imaju nedovoljno medicinsko obrazovanje, a ako simptomi ne nestaju, tek onda se obrate liječnicima. Većinu ugriza je nemoguće spriječiti, jer se dogode slučajno, no najbolje pravilo je izbjegavati i ne uznemiravati zmije koliko god je to moguće.

		
Prosječan broj ugriza otrovnica	Prosječan broj ugriza otrovnica	Prosječan broj ugriza otrovnica
231 866 – 961 508	89 009 – 417 343	1 723 – 99 268

**Slika 1.** Prikaz područja na kojima žive najviše otrovnih zmija: a) Indija i jugoistočna Azija, b) središnji dio Afrike (pustinja Sahara), c) Meksiko i južna Amerika s procijenjenim brojem ugriza otrovnih zmija po godini<sup>1</sup>



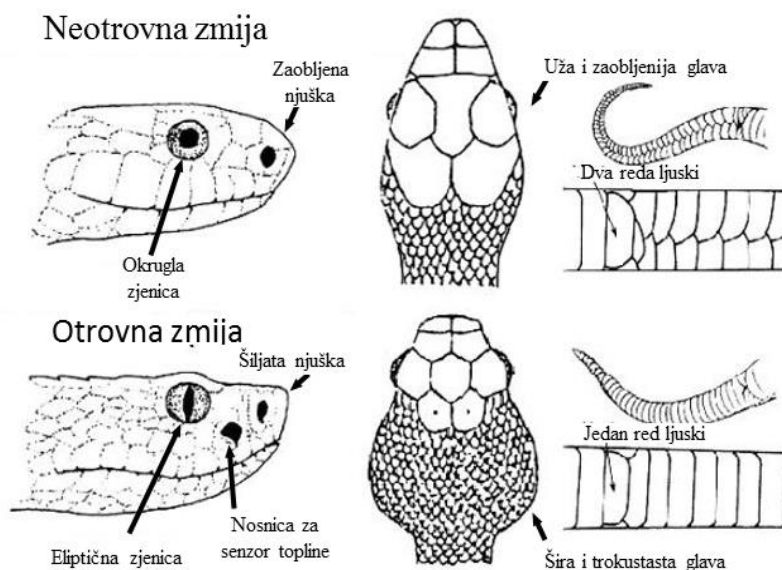
**Slika 2.** Najčešće otrovne zmije koje se nalaze na području Indije i jugoistočne Azije, Afrike te Meksika i južne Amerike

## 1.2. Otrovnice i neotrovnice

### 1.2.1. Glavne razlike otrovnih i neotrovnih zmija

Iako se ne može uvijek sa 100 %-tnom sigurnošću odrediti je li zmija otrovna ili nije, postoje neka karakteristična obilježja pomoću kojih se otrovne zmije razlikuju od neotrovnih. Prva razlika je oblik zjenica. Otrovnice imaju oči koje podsjećaju na mačje i zjenice zašiljenih krajeva, dok neotrovne zmije imaju okrugle zjenice. Postoje i iznimke, a primjer toga je američka koraljna zmija, vrlo otrovna zmija okruglih zjenica.<sup>2</sup>

Sljedeća razlika je oblik glave. Otrovnice imaju širu i trokutastu glavu, dok je kod neotrovnica glava uska, malo šira od vrata. Između očiju otrovnih zmija nalazi se dodatna nosnica, koja im služi kao senzor topline i pomaže im za lociranje plijena (posebno u mraku), a nije prisutna kod neotrovnica. Na vrhu repa nekih otrovnica nalazi se „zvečka”, kojom proizvode sikući zvuk kad se nalaze u opasnosti. Takvu „zvečku” imaju samo zmije iz porodice čegtruša.<sup>2</sup> Na slici 3 prikazane su neke osnovne razlike otrovnih i neotrovnih zmija.



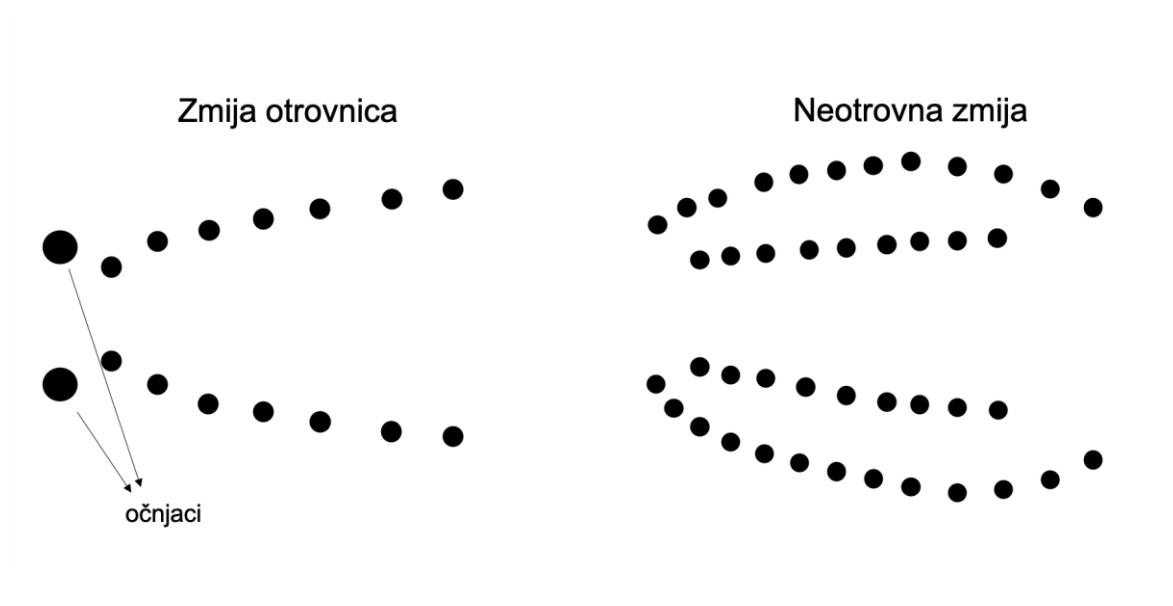
**Slika 3.** Razlike između otrovnih i neotrovnih zmija<sup>3</sup>

Kao dva specifična obilježja otrovnosti mogu se navesti plavo-crna boja unutrašnjosti usta po kojima se može prepoznati crna mamba,<sup>4</sup> otrovna zmija koja živi na području Sahare te oblik vrata kobre, kojeg može raširiti u karakterističan klobuk kad osjeća opasnost.

Otrovne zmije najčešće su žarkih boja i imaju jedan red ljuski duž tijela, dok neotrovne zmije imaju dva reda ljuski i jednoboje su.

### 1.2.2. Ugriz i posljedice ugriza

Osim prethodno navedenih obilježja, otrovna zmija može se prepoznati i po ugrizu. Bez obzira radi li se o ugrizu otrovne ili neotrovne zmije, u oba slučaja potrebna je brza i odgovarajuća medicinska pomoć. S obzirom na to da samo otrovnice imaju očnjake pomoću kojih ispuštaju otrov, kao posljedica ugriza vide se dvije rupe od njihovih očnjaka i jedan red zubi, a od ugriza neotrovnice ostaju tragovi dva reda zubi koji se nalaze na gornjoj čeljusti zmije. (slika 4). Ponekad ne ostaju tragovi očnjaka, pa se prema ugrizu ne može sa sigurnošću ustvrditi je li zmija otrovna ili nije. Zmija ne mora ispustiti otrov pri svakom ugrizu, pogotovo ako se radi o samoobrani ili borbi za teritorij. Razlog tome je što je količina otrova ograničena te ga čuvaju za plijen kojeg žele ubiti. Takav ugriz se još zove i suhi ugriz.<sup>5</sup>



**Slika 4.** Tragovi ugriza otrovnice i neotrovnice

Simptomi koji se javljaju nakon ugriza neotrovnice su blaži i uključuju otjecanje mjesta ugriza, svrbež, crvenilo i blaže krvarenje rane. Nakon ugriza otrovne zmije javljaju se jaka bol, nesvjestica, vrtoglavica, mučnina, zamagljeni vid, crvenilo i modrice oko rane, temperatura te ubrzani rad srca.<sup>5</sup> Ne moraju se pojaviti svi simptomi kako bi se potražila liječnička pomoć, obično se javljaju samo neki od navedenih.

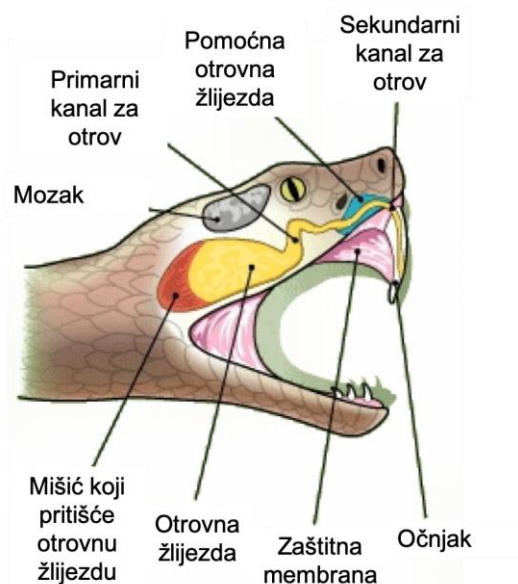
Iako ugrizi neotrovnih zmija nisu smrtonosni, u nekim slučajevima mogu se javiti različite kožne infekcije ili alergijske reakcije pa se stoga ne smiju olako shvaćati.

## § 2. OTROVI I PROTUOTROVI

### 2.1. Zmijski otrovi

#### 2.1.1. Osnovno o otrovima

Otrovi su smjesa ugljikohidrata, proteina, peptida, lipida i ostalih organskih spojeva. Guste su, mliječno bijele ili svijetložute, tekućine. Uloga im je onesposobljavanje i razgradnja plijena tijekom probave. Imaju kiselu pH-vrijednost i topljivi su u vodi. Za njihovu toksičnost uz proteinske komponente jednako su zaslužni i neproteinski dijelovi.<sup>6</sup> Glavna komponenta otrova su proteini (koji čine oko 95 % sadržaja otrova), polipeptidi i enzimi, a sadrže i različite anorganske ione koji su odgovorni za aktivnost enzima, npr.  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  itd. Otrov je pohranjen u otrovnim žlijezdama koje se nalaze iza očiju zmijske. Kad zmijska ugrize plijen, dolazi do kontrakcije mišića koji pritisnu otrovnu žlijezdu, otrov izlazi van te kroz kanale putuje do šupljih očnjaka pomoću kojih ga zmijska uštrca u plijen (slika 5). Nemaju sve otrovne šuplje očnjake. Takvi očnjaci nisu povezani s otrovnim kanalom pa prema tome ne služe za ubrizgavanje otrova i smatraju se zubima.



Slika 5. Dijelovi otrovnog puta<sup>7</sup>

Čim je otrov ispušten, odmah počinje proizvodnja nove količine. Ovisno o vrsti zmijske, to može potrajati od nekoliko dana pa sve do mjesec dana (čegrtuše). S obzirom na to da se otrov sastoji najviše od proteina, nije štetan za zmijsku. Proteinski toksini moraju biti apsorbirani u krvotok ili tkivo kako bi postali štetni.<sup>8</sup> U ostalim slučajevima, želučana kiselina i probavni enzimi razgrađuju ih na aminokiseline. Osim toga, zmijske imaju antitijela koja ih štite od vlastitog otrova, a otrovne žlijezde su evolucijski smještene tako da sprječavaju ulazak otrova u tijelo zmijske.

### 2.1.2. LD<sub>50</sub> test

Kad se govori o otrovima, često pitanje je kolika količina otrova je smrtonosna. Nisu svi zmijski otrovi jednako toksični. Smrtonosnost se određuje LD<sub>50</sub> testom (eng. *median lethal dose*), a odnosi se na onu količinu otrova koja dovodi do smrti 50 % testne populacije.<sup>9</sup> Najčešće se mjeri na životinjama kao što su štakori ili miševi. Izražava se u miligramima (mg) otrova na 100 grama (g) za manje životinje ili po kilogramu (kg) za veće. Što je vrijednost LD<sub>50</sub> manja, zmijska je otrovnija.

U nekim slučajevima koriste se mjere poput LD<sub>1</sub> ili LD<sub>99</sub> (količina otrova potrebna za smrt 1 % ili 99 % testne populacije). Primjeri različitih otrovnosti zmijske navedeni su u tablici 1.

**Tablica 1.** Toksičnost zmijskih otrova s izmjerenim LD<sub>50</sub> vrijednostima

Zmija	LD <sub>50</sub> (miševi) / mg kg <sup>-1</sup>	Smrtonosna količina za ljude / mg kg <sup>-1</sup>	Prosječna količina otrova po ugrizu / mg	Letalno razdoblje
Indijska kobra	0,28	12	60	8 h
Obični krait	0,09	6	20	18 h
Russelova ljutica	0,1	15	63	3 dana
Pješčana efa	6,65	8	13 – 40	41 dan

Najotrovnija zmijska na svijetu je australski kopneni taipan. Za njezin otrov LD<sub>50</sub> iznosi 0,025 mg kg<sup>-1</sup>. Jednim ugrizom može ispustiti i do 110 mg otrova, tj. količinu dovoljnu da ubije oko 100 odraslih muškaraca ili 250 000 miševa. Ako je ugriz neliječen, smrt nastupa za 30 do 40 minuta. Osim LD<sub>50</sub> testa, postoji još mnogo različitih načina za utvrđivanje toksičnosti. Slična

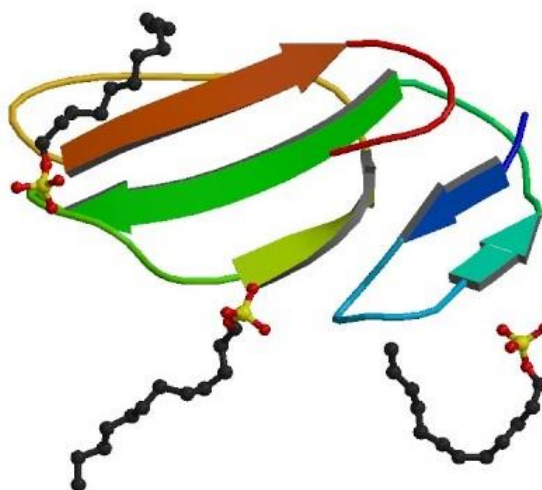
metoda je  $LC_{50}$  test (eng. *median lethal concentration*) koja se koristi za mjerenje koncentracije kemikalija u zraku ili u vodi.

### 2.1.3. Podjela otrova

Ovisno o vrsti, otrov djeluje na krvne stanice i tkivo (razaranje tkiva, zatajenje bubrega, slom krvotoka) ili na živčani sustav (poremećaji osjetila, gušenje, paraliza). Prema tome razlikujemo citotoksine, neurotoksine i hemotoksine.

Citotoksini su jednolančani polipeptidi sastavljeni od 60 do 62 aminokiseline. Njihovu sekundarnu strukturu čine tri antiparalelna  $\beta$ -lanca povezana s četiri disulfidna mosta i brojnim vodikovim vezama<sup>10</sup> (slika 6).  $\beta$ -lanci su oblikovani u hidrofobne omče koje omogućuju vezanje citotoksina na fosfolipidnu membranu, što dovodi do njezine depolarizacije, oštećenja mitohondrija, lizosoma i u konačnici apoptoze (stanične smrti). Citotoksini uništavaju stanice tkiva ili organa i time uzrokuju nekrozu – odumiranje tkiva, koje može biti smrtonosno. Oni također sudjeluju u razgradnji plijena.

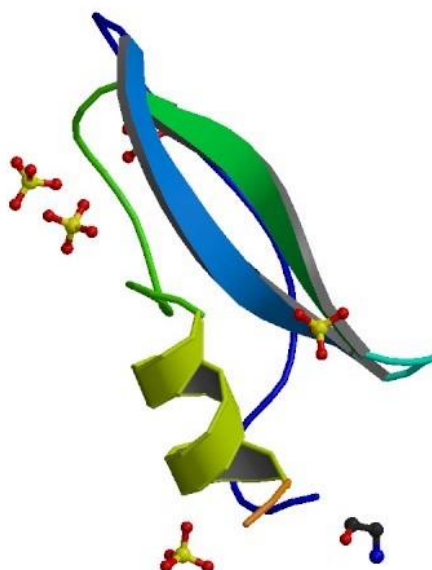
Prema tipu stanice na koje djeluju mogu se dodatno podijeliti na miotoksine (oštećuju mišićne stanice), kardiotoxine (oštećuju srčane stanice), nefrotoksine (oštećuju stanice bubrega) itd. Otrovi kobre sastavljeni su većinom od citotoksina.



Slika 6. Kardiotoxin A III iz otrova kobre<sup>11</sup>

Neurotoksini su kemijske tvari koje su štetne za periferni živčani sustav. Oni ometaju neurotransmitere – kemijske signale između živčanih stanica i smanjuju njihovu proizvodnju (presinaptički neurotransmiteri) ili blokiraju receptore na koje se neurotransmiteri vežu (postsinaptički). Druga vrsta neurotoksina blokira kanale za prijenos kalcija ili kalija, važne za prijenos signala među neuronima. Konačan rezultat toga je otežano disanje, paraliza mišića i smrt. Neurotoksični otrov proizvode otrovne guje (*Elapidae*), zmije prve od dviju velikih porodica otrovnica. Neki primjeri neurotoksina su:

- kobrotoksin – blokira acetilkolinske receptore, nalazi se u otrovu kobri
- kalciseptin – blokira kanale za prijenos kalcija, imaju ga crne mambe<sup>8</sup>
- dendrotoksini - blokiraju izmjenu iona duž membrane pa ne nastaje živčani impuls što rezultira paralizom, pronađen u mambi
- $\alpha$ -neurotoksini – poprimie oblik molekule acetilkolina, vežu se na njihove receptore i onemogućavaju daljnji prijenos signala, a rezultat toga je utrnulost i paraliza mišića. Nalazi se u otrovu vodene zmije, kobre, kraitova...



**Slika 7.**  $\alpha$ -dendrotoksin iz otrova zelene mambe<sup>11</sup>

Hemotoksini se nalaze u otrovima ljutica (*Viperidae*), koje su druga najveća porodica otrovnih zmija.<sup>8</sup> Oni ometaju zgrušavanje krvi tako što uzrokuju raspadanje eritrocita što dovodi do unutarnjeg krvarenja. Nakupljanje takvih oštećenih eritrocita ometa normalan rad bubrega.



Druga vrsta hemotoksina potiče stvaranje krvnih ugrušaka sljepljivanjem trombocita, a posljedica toga je zatajenje rada srca.

#### 2.1.4. Enzimi u otrovima

Iako proteini čine većinu u zmijskim otrovima, važna komponenta su i enzimi. S obzirom na to da nemaju pretjerano fleksibilnu strukturu, temperaturno su stabilni i otporni na proteolizu. Neki postoje i u obliku kompleksa. Smatra se da su zmijske vrste s najvećom raznolikošću enzima u prirodi.<sup>12</sup> Oni općenito potiču kemijske reakcije koje ubrzavaju onesposobljavanje plijena, a postoje i enzimi koji nisu toksični. Svaki otrov sadrži različite vrste enzima. Nađeno je mnogo vrsta enzima, no najčešći su: acetilkolinesteraza, serinske i metaloproteaze, L-aminokiselinske oksidaze i fosfolipaze.

Acetilkolinesteraza je enzim kojeg nemaju ljutice (*Viperidae*), ali je prisutan u otrovima svih vrsta zmija iz porodice otrovnih guja (*Elapidae*) osim mambi. To je primjer enzima koji nije toksičan, a ima vrlo bitnu ulogu u prenošenju živčanog impulsa. Acetilkolinesteraza je aktivna pri lužnatim pH-vrijednostima (8,5) i do temperature od 45°C.<sup>13</sup> Acetilkolinesteraza hidrolizira acetilkolin na kolin i acetatnu skupinu čime završava živčani impuls. Kad ne bi došlo do hidrolize, mišić bi se nastavio nekontrolirano trzati. Taj enzim imaju i neke neotrovne zmijske.

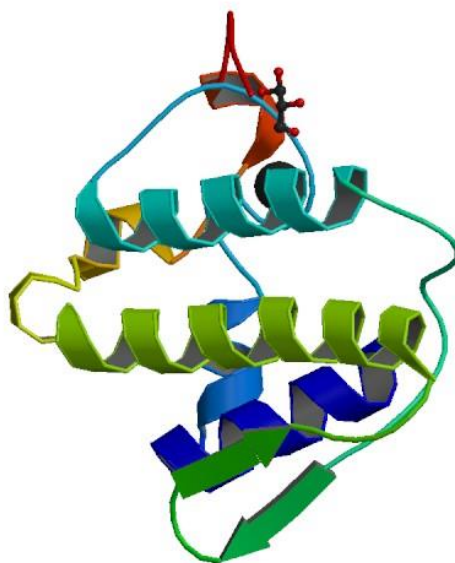
Serinske i metaloproteaze su enzimi prisutni u većini ljutica (*Viperidae*). Za razliku od acetilkolinesteraze, ovi enzimi su štetni. Metaloproteaze sadrže cink ili kobalt koji su bitni za njihovu katalitičku aktivnost. Obje vrste proteaza mogu se podijeliti na više skupina, ovisno o molekularnoj masi i katalitičkoj ulozi, no zajednička uloga im je da aktiviraju različite faktore zgrušavanja krvi. Time ubrzavaju zgrušavanje krvi i nastajanje krvnih ugrušaka.

L-aminokiselinske oksidaze (LAO) kataliziraju oksidativnu deaminaciju brojnih L-aminokiselina, prema reakciji:  $RCHNH_2COOH + O_2 + H_2O \longrightarrow RCOCOOH + NH_3 + H_2O_2$ , pri čemu nastaju vodikov peroksid, amonijak i  $\alpha$ -keto kiselina. Sve aminokiseline u proteinima su L-izomeri, tj. zakreću ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, no postoje i D-aminokiseline koje se mogu pronaći u membranama bakterija.

Aminokiselinske oksidaze su termolabilne, što znači da pri jako niskim temperaturama postaju inaktivne, a zagrijavanjem se njihova aktivnost vraća. Sadrže nekovalentno vezane flavine, koji otrovima daju karakterističnu svjetložutu boju i doprinose njihovoj toksičnosti.<sup>14</sup> Imaju citotoksični efekt na zdrave stanice, no taj je štetni utjecaj zanemariv, jer aminokiselinske

oksidaze potiču staničnu smrt (apoptozu)<sup>14</sup> stanica karcinoma, čime se one prestaju dijeliti. Taj mehanizam se još proučava u raznim medicinskim istraživanjima.

Fosfolipaze su posebno velika skupina enzima. Do danas je okarakterizirano par stotina fosfolipaza. Među njima posebno se ističu fosfolipaze A<sub>2</sub>, skupina enzima prisutna u svim zmijskim otrovima. Možemo ih opisati kao male proteine sastavljene od 115 do 133 aminokiselina. Njihovu tercijernu strukturu čine 3  $\alpha$ -uzvojnice koje vežu katalitički važne kalcijeve ione te jedna antiparalelna  $\beta$ -ploča.<sup>15</sup>



**Slika 8.** Kristalna struktura fosfolipaze A<sub>2</sub> s vezanim kalcijevim ionima<sup>11</sup>

Fosfolipaze A<sub>2</sub> kataliziraju hidrolizu esterske veze u fosfolipidima, čime nastaju masne kiseline i lizofosfolipidi. Prema jakosti katalitičke aktivnosti mogu se podijeliti na jake, srednje i slabe antikoagulanse. Vezanjem na koagulirajuće faktore ometaju njihovo sudjelovanje u normalnom zgrušavanju krvi. Imaju neurotoksično, kardiotoksično i miotoksično<sup>15</sup> djelovanje, uzrokuju stvaranje edema, snižavaju krvni tlak te uzrokuju krvarenje, što su samo neki od mnogih štetnih učinaka.

Upravo zato mnogi protuotrovi svoje djelovanje temelje na inhibiciji fosfolipaze A<sub>2</sub>.

## 2.2. Protuotrovi

### 2.2.1. Metoda priprave protuotrova

Mnogi zmijski ugrizi potencijalno su smrtonosni zbog otrova koji dospije u krv žrtve, ali danas je broj smrtnih slučajeva u razvijenim zemljama drastično smanjen upravo zahvaljujući protuotrovima. Metoda sinteze protuotrova standardizirana je početkom dvadesetog stoljeća. Zahtijeva vrijeme pa se protuotrovi pripremaju unaprijed i pravilno skladišteni, drže se u bolnicama i ljekarnama do trenutka kad zatrebaju.

Da bi napravili protuotrov, znanstvenici moraju skupiti uzorke otrova, razrijediti ga i injektirati u domaću životinju, najčešće konja. Doza je premalena da bi naštetila konju, ali otrov aktivira imuni sustav koji brani organizam proizvodnjom antitijela, posebne proteine koji napadaju i onesposobljavaju toksine. Za to je potrebno 8 do 10 tjedana.

Zatim slijedi pročišćavanje. Nastala antitijela izoliraju se iz krvne plazme domaćina, pročiste i koriste kao baza za protuotrov. Iako se serum pročišćava raznim metodama i dalje u njemu zaostaju proteini koji mogu djelovati kao antigeni što kod nekih pacijenata može uzrokovati mučninu ili alergijske reakcije.

U zadnjem koraku proizvodnje protuotrova pomoću odgovarajućeg enzima, antitijela se razgrade i iz njih izoliraju aktivne tvari. Ovaj proces je skup i dugotrajan jer je količina otrova sakupljena iz jedne zmijske vrlo mala, a brojne kompanije zbog uštede pročišćavanje ne vrše korektno što dovodi do nuspojava kod pacijenata.

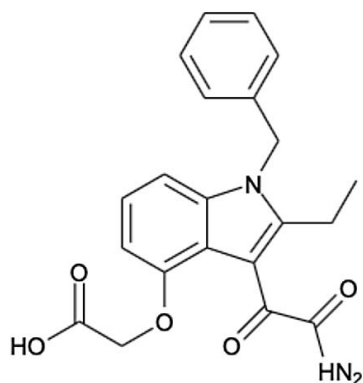
### 2.2.2. Vrste protuotrova

Protuotrov koji djeluje samo na specifični otrov za koji su nastala antitijela naziva se monovalentni. U ovom slučaju problem je ako pacijent ne zna točno koja ga je zmijska ugrizla. Tad se pacijentu daje polivalentni protuotrov napravljen od smjese antitijela za otrove najučestalijih zmijski na tom području. Takav protuotrov učinkovit je za niz vrsta zmijski istovremeno ili za najučestalije zmijske vrste na tom području. Djeluje tako da uđe u krvotok i

neutralizira molekule toksina na koje nailazi. Bitna stvar je da pacijent što prije potraži pomoć jer protuotrov ne može ispraviti već načinjenu štetu. Ovakvo liječenje ima nedostatke pa se pokušavaju pronaći alternativne metode koje bi bile brže, jeftinije, ali i ne manje učinkovite.

Tvrtka Ophirex proučava lijek varespladib<sup>16</sup> koji bi bio puno jednostavniji za skladištenje od tipičnih zmijskih protuotrova i jeftiniji za masovnu proizvodnju, a uz to bi imao i puno brže djelovanje od klasičnog protuotrova.

Većina zmijski u svijetu u otrovu ima enzim fosfolipazu A<sub>2</sub> koji razgrađuje lipide u staničnoj membrani i tako uništava stanice. Varespladib se veže na hidrofobno aktivno mjesto fosfolipaze A<sub>2</sub> i tako je destabilizira. Lijek je uspješno testiran na 28 zmijskih vrsta među kojima su crna mamba, istočna koraljna zmijski i riđovka.<sup>16</sup>



**Slika 9.** Strukturni dijagram molekula aktivnog sastojka Varespladiba

Jedna od većih prednosti Varespladiba je mogućnost prolaska kroz tkiva kroz koja klasični protuotrovi ne mogu proći. Jednostavnost primjene ovog lijeka povećava šansu za preživljavanje žrtve, jer unesrećeni ne mora biti transportiran do najbliže zdravstvene ustanove da bi se započelo liječenje već može uzeti lijek odmah na mjestu nesreće bez pomoći stručne osobe.

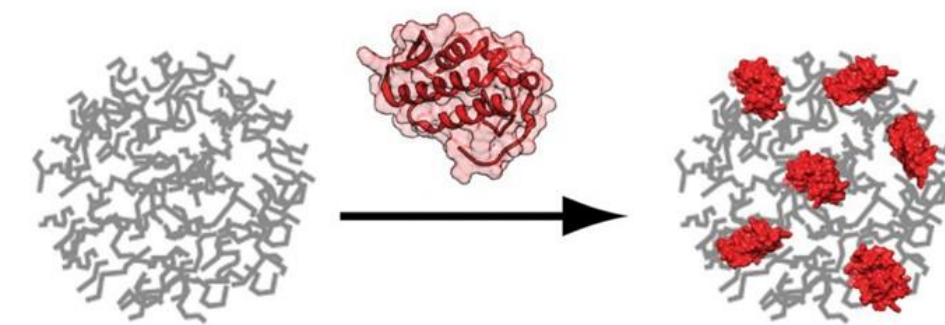
Unatoč ovim prednostima Varespladib je još u fazi proučavanja te bi se zasad morao koristiti u kombinaciji s klasičnim protuotrovima. Prednosti klasičnog protuotrova su duže vrijeme poluraspada zbog kojeg duže cirkulira organizmom i djelovanje na komponente otrova koje nisu iz skupine fosfolipaza.

Sljedeća metoda liječenja koja se trenutno proučava uključuje hidrogel koji se sastoji od polimernih nanočestica.<sup>17</sup> Polimerne nanočestice se pomiješaju s gelom nakon čega slijedi

hlađenje ili se umeću u gel kasnije nakon što je on već formiran. Hidrogel djeluje tako da se proteini iz otopine „zalijepe“ za polimerne nanočestice te zajedno s njima tvore nakupinu koja se zove korona. Mijenjajući sastav polimera nanočestica, mogu se selektivno uklanjati određeni proteini iz otopine. Sintetizirane su vrste koje tvore korone s molekulama fosfolipaze A<sub>2</sub> iz zmijskog otrova i tako je sprječavaju u negativnom djelovanju na staničnu membranu (slika 10). Nanočestice završavaju u jetri, a tamo se lako pročiste i uklone iz tijela.

Da bi se došlo do odgovarajuće kombinacije nanočestica koje će djelovati na otrov eksperimentiralo se s brojnim kombinacijama monomera poput akrilne kiseline, *N*-fenilakril amida, *N*-izopropilakrilamida i *N,N'*-metilenbis(akrilamida).<sup>17</sup>

Gel se ne mora skladištiti u hladnjacima što ga čini pogodnim lijekom za tropska i siromašna područja, ali nije dizajniran da zamijeni protuotrove već samo da stabilizira žrtvu dok ne dobije odgovarajuću medicinsku pomoć.



**Slika 10.** Prikaz djelovanja polimernih nanočestica. Nanočestice (lijevo) zarobe molekulu fosfolipaze A<sub>2</sub> (u sredini) i time ona postaje inaktivna<sup>17</sup>

### 2.2.3. Buduća istraživanja

Uz potragu za zamjenom za klasični protuotrov paralelno se radi na istraživanjima koja bi pridonijela usavršavanju njegovih svojstava i proizvodnje. Pokušava se naći metoda koja bi izbjegla korištenje domaćina za stvaranje antitijela i potrebu za uzorkom zmijskog otrova.

Biotehnologija nudi rješenje u ljudskim monoklonskim antitijelima. To su proteini dobiveni genetičkim inženjeringom iz kloniranih imunih stanica, identični jedan drugom u sekvenci aminokiselina.<sup>18</sup> Napadaju specifične tvari iz otrova i tako onemogućuju njegovo djelovanje. Ako se uspiju naći takve stanice koje bi djelovale na fosfolipazu A<sub>2</sub> i ostale štetne tvari iz otrova,

to bi bio veliki uspjeh u ovom području istraživanja. Proces proizvodnje traje samo nekoliko dana, monoklonska antitijela se zadržavaju u tijelu dulje nego antitijela dobivena iz krvnog seruma konja, jer ih imunološki sustav ne tretira kao strano tijelo, a kako su to ljudske stanice neće biti nuspojava i alergijskih reakcija koje uzrokuju konjski proteini.

Dva načina na koja bi se moglo dobiti takva antitijela. Prvi je da se ciljni proteini iz zmijskog otrova ubacuju u miša, izoliraju nastala antitijela i potom humaniziraju. Drugi način je da se iz baze ljudskih antitijela pronađe antitijelo koje bi se vezalo za ciljni protein iz otrova. Jednom ili drugom metodom potrebno je doći do antitijela za sve toksične komponente zmijskog otrova i pomiješati ih u jedan serum koji bi se tad mogao koristiti kao lijek za tu vrstu otrova.

Ova istraživanja još su u povojima i potrebno je još mnogo testiranja i proučavanja da bi se počelo razmišljati o njihovoj primjeni na ljudima. U budućnosti, kad to bude moguće, bit će potrebno katalogizirati sve toksične supstance iz otrova i nekom od metoda doći do antitijela koja bi ih neutralizirala da bi se mogao napraviti lijek. Ovaj je proces dugotrajan i spor, ali rezultirat će povećanjem broja preživjelih nakon ugriza zmiје, mogućnošću liječenja u siromašnim i tropskim zemljama gdje će olakšati skladištenje te smanjenjem nuspojava koje se javljaju nakon uzimanja protuotrova.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. A. Kasturiratne, A.R.Wickremasinghe, N. de Silva, N.K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, et al., *Chem. Eng. News* **5**(11) (2008) 1591-1604.
2. T.M.Davidson, J.Eisner, *Wilderness Environ. Med.* **1** (1996) 38-45.
3. <http://www.247wildlife.com/identify-snakes.html> (datum pristupa 17.7.2019.)
4. <https://www.nationalgeographic.com/animals/reptiles/b/black-mamba/> (datum pristupa 17.7.2019)
5. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/324007.php> (datum pristupa 18.7.2019.)
6. P.K. Goswami, M.Samant, R.Srivastava, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**(5) (2014) 4-7.
7. <https://www.epicalyx.org/2012/02/fang.html> (datum pristupa 19.7.2019.)
8. <https://www.thoughtco.com/how-snake-venom-works-4161270> (datum pristupa 20.7.2019.)
9. E. Chinedu, D.Arome, F.Ameh, *Toxicol. Int.* **20**(3) (2013) 224-226.
10. T.Das, S.Bhattacharya, A.Biswas, S.D.Gupta, Gomes, A., Gomes, A., *Toxicon* **65**(7-8) (2013) 1065-1072.
11. <http://www.rcsb.org/> (datum pristupa 21.7.2019.)
12. E.A.Zeller, *Experientia* **33**(2) 143–150.
13. M. Ahmed, N. Latif, RA. Khan, A. Ahmad, JBT Rocha et al., *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **18**(2) (2012) 236-243.
14. L.B. Campos, M.B. Pucca, E.C. Roncolato, J.C. Netto, J.E. Barbosa, *J. Biochem. Mol.Toxicol.* **26**(8) (2012) 308-314.
15. D. Saikia, A.K. Mukherjee, *Snake Venoms*, Springer Science and Business Media Dordrecht, 2015, str. 87-104.
16. M.Lewin, S.Samuel, J.Merkel, P.Bickler, *Toxins* **8**(9) (2016) 1-16.
17. B.Campos Seijo, A.Yarnell, K. Bryson, *Chem. Eng. News* **97**(4) (2019) 30-36.
18. A.H. Laustsen, A. Karatt-Vellatt, E.W. Masters, A.S. Arias, U.Pus et al., *Nat. Commun.* **9**(1) (2018) 1-9.